



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук  
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика  
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru), [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)  
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

29.05.17 № 105-217.1-426

на № 15309-17/168/2 от 24.04.2017



### О Т З Ы В

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук - на диссертационную работу Шарифулина Дмитрия Евгеньевича “Пептиды рибосомных белков eS26, uS7 и uS3, участвующие в инициации трансляции у млекопитающих”, представленную к защите в диссертационный Совет по защите докторских и кандидатских диссертаций (Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

#### Актуальность темы диссертационной работы, научная новизна работы

Работа Д.Е. Шарифулина посвящена важным аспектам изучения РНК-белковых и белок-белковых взаимодействий в рибосомах млекопитающих. В частности, автором исследовались конкретные контакты структурных рибосомных белков с информационной РНК (мРНК) и с белковыми факторами инициации трансляции eIF2 и eIF3. Все проведенные эксперименты концентрировались вокруг мРНК-связывающего канала 40S рибосомной субчастицы, важнейшего функционального центра рибосомы. Рибосома это очень сложная клеточная фабрика синтеза белковых молекул, которая использует для этого процесса множество дополнительных белков, т.н. факторов трансляции. Особенно сложен процесс трансляции у млекопитающих, где только для инициации трансляции привлекается дополнительно около полутора десятка белковых факторов, многие из которых сами состоят из нескольких белковых субъединиц. Еще лет тридцать тому назад, когда не существовало

кристаллографической модели рибосомы, ученые полагали, что стоит закристаллизовать рибосому и разрешить ее структуру, дела пойдут намного быстрее, и мы в скором будущем будем знать, как работает эта молекулярная машина. Еще больший оптимизм внушило быстрое развитие метода криоэлектронной микроскопии, который позволяет обойтись без кристаллизации и, более того, позволяет эффективно исследовать комплексы рибосом и их субчастиц с рибосомными лигандами - мРНК, тРНК и факторами трансляции. Сегодня мы уже знаем общее строение комплексов рибосом и их субчастиц с рядом факторов инициации трансляции, в частности, с eIF2, eIF3, eIF1, eIF1A. Однако, разрешение существующих методов структурного анализа недостаточно для понимания структурных основ внутририбосомных взаимодействий, для этого нужно атомное разрешение, а это пока труднодостижимо. Еще сложнее выглядит задача исследования динамики работы рибосомы, конформационных переходов во время ее работы. Автор диссертации для исследования внутририбосомных взаимодействий использует методы биоорганической химии, в частности, сшивание рибосомных лигандов друг с другом, с последующей идентификацией контактирующих участков с помощью ограниченного протеолиза, электрофореза и масс-спектрометрии. Конечно, такой подход не принесет быстрого решения различных аспектов работы рибосом на разных стадиях трансляционного цикла, но на сегодняшний день он представляется единственно возможным. Поэтому актуальность работы диссертанта не вызывает никаких сомнений. Понять, как работает рибосома на всех стадиях трансляции это архиважная задача, не только для фундаментальной молекулярной биологии, но и для прикладных исследований. Совершенно не исключено, что в будущем у рибосомы можно будет позаимствовать некоторые принципы и механизмы, полезные даже для технических изобретений.

Важно отметить, что Д.Е. Шарифулин работает в лаборатории, которая всемирно известна своими работами по применению химических методов при исследовании РНК-белковых и белок-белковых взаимодействий в животных клетках, прежде всего в клетках человека. Этот коллектив владеет широчайшим арсеналом методов исследования таких взаимодействий, постоянно пополняет этот арсенал, и диссертант освоил и развил эти подходы и методические приемы.

Диссертация построена по традиционному плану: Введение, обзор литературы, методическая часть, основная часть, выводы, список литературы. Диссертант подробно описал все эксперименты, которые он провел, хорошо и в доступной форме их обсудил, полностью привел все методики в экспериментальной части диссертации. При этом диссертация достаточно компактна и насчитывает 144 стр., включая список литературы на 13 стр., содержащий 259 ссылок. Работа содержит 9 таблиц и 46 рисунков, хорошо оформлена,

число орфографических или стилистических ошибок очень незначительно.

**Обзор литературы.** Основной части работы предпослан Обзор литературы, посвященный структурно-функциональным аспектам инициации трансляции у млекопитающих, который прекрасно вводит читателя в круг тех проблем, которыми занимается автор и его коллеги. То, как написана эта глава, показывает, что автор совершенно свободно ориентируется в области, в которой он работает. Он критически анализирует опубликованные данные, хорошо видит белые пятна и несоответствия между данными, опубликованными разными научными группами. Это говорит о зрелости исследователя и о полном владении информацией. Особенно тщательно диссертант разобрал механизмы кеп-независимой инициации трансляции. Главное внимание уделено механизмам, которые используются РНК-содержащими вирусами с привлечением структурных элементов СТЕ (энхансерные элементы в 3'-НТО мРНК) и IRES-элементов, обеспечивающих посадку рибосомы на внутренние участки мРНК в обход классической модели сканирования. Возможно, сознательно, автор не рассматривает клеточные IRES-элементы, хотя эта концепция имеет много сторонников. Это говорит о скептическом отношении к ним автора диссертации. Однако упомянуть в обзоре эту недоказанную концепцию все же стоило. Обзор прекрасно иллюстрирован и, что очень ценно, содержит краткое заключение, которое обеспечивает переход от литературных данных к нерешенным задачам, к которым автор обращается в своем исследовании.

**Основная часть диссертации.** Переходя собственно к самой работе Д.Е. Шарифулина, следует сразу отметить, что прочтение этой главы полностью убеждает, что все или почти все описанные в ней эксперименты сделаны или им самим или при его непосредственном участии. Автор в основном сконцентрировал свои усилия на изучении мРНК-связывающего канала 40S субчастицы рибосом человека, на исследовании взаимодействий в этой важнейшем функциональном участке рибосомы. Им получен ряд интересных данных, относящихся к этому функциональному участку.

1. Диссертантом показано, что пептид 62-YxxPKxYxK-70 белка 40S рибосомной субчастицы eS26 расположен на внешней поверхности субчастицы вблизи от места выхода мРНК из мРНК-связывающего канала. Во всяком случае, нуклеотиды мРНК в положениях от -6 до -12 в 5'-НТО мРНК (цифры приводятся относительно инициаторного кодона, где A+1) пришиваются именно к этому пептиду. Интересно, что по литературным данным туда же пришивается  $\alpha$ -субъединица фактора eIF3.
2. Д.Е. Шарифулин анализировал, с каким фактором инициации взаимодействует (и взаимодействует ли) рибосомный белок uS7 в составе 48S иницирующего комплекса.

Взаимодействие изучалось с помощью сшивания белков формальдегидом (сшивки нулевой длины). Диссертант нашел, что uS7 взаимодействует с  $\alpha$ -субъединицей фактора eIF2 и что во взаимодействие вовлечены 2 аминокислотные последовательности от каждого белка. Это важные и интересные данные, учитывая ключевую роль фактора eIF2 в локализации иницирующего кодона в эукариотических мРНК.

3. Несколько более дискуссионными выглядят данные по сшивкам мРНК с белком uS3. Этот белок в иницирующем и элонгирующем комплексах расположен где-то вблизи кодирующих триплетов, недалеко от участка входа матрицы в мРНК-связывающий канал. Его пептид 55-TQNVLGEKGR-64 «охотно» пришивается к матричному олигонуклеотиду как в присутствии, так и в отсутствие всякой тРНК, то есть независимо от того, заякорена ли модельная мРНК с помощью тРНК в декодирующем центре или нет. Автор предполагает, что этот пептид удален от мРНК-связывающего центра, хотя нигде в работе не сказано, какова протяженность мРНК-связывающего канала. Диссертант делает предположение, что uS3, во всяком случае, указанный пептид, вообще занимает в 40S субчастице обособленное положение и может так быть, что он даже не входит в состав мРНК-связывающего центра. Можно предложить другое объяснение: uS3 наверное действительно находится вне участка взаимодействия антикодонов тРНК с мРНК, то есть вне Р- и А-участков 40S рибосомы, но остается в пределах дальней от них области мРНК-связывающего канала (в 3'-сторону) и служит для дополнительной фиксации мРНК в этом канале. Необходимо помнить, что рибосома покрывает участок 28-30 нуклеотидов, из которых согласно данным тоу-принтинга (toe-printing) 16-17 нуклеотидов приходится на область после считываемого кодона.
4. Наиболее дискуссионная часть работы, это изменение доступности uS3 для модификации в зависимости от числа нуклеотидных звеньев после иницирующего кодона матричного полинуклеотида. Соответствующий пептид uS3 становится недоступным для пришивания окисленного конца матрицы при длине после стартового кодона менее 4-х нуклеотидов. Так же ведет себя фрагмент HCV IRES, если он не имеет после стартового AUG триплета каких-либо нуклеотидных остатков, то есть это не зависит от способа посадки 40S рибосомы на инициаторный участок мРНК. Удивительно, но в 80S иницирующем комплексе доступность uS3 не зависит от длины кодирующей части. Авторы приводят данные в пользу того, что в случае коротких кодирующих концов модельных мРНК, описанный выше пептид uS3 экранирован в 48S

комплексе фактором инициации eIF3j, а при более длинных кодирующих частях он диссоциирует и заменяется хеликазой DHX29. Такое объяснение, конечно, исключить нельзя, но оно несколько натянуто, потому что трудно понять, почему и зачем так происходит.

Как и любая другая работа, диссертация Д.Е. Шарифулина не свободна от недостатков. Некоторые из неопределенностей и шероховатостей в интерпретации результатов, уже отмечены выше. Из других недостатков следует упомянуть, что автор использует для своих мРНК-рибосомных комплексов очень короткие кодирующие последовательности. Интересно было бы проверить, будет ли что-нибудь меняться при переходе к более длинным гетерогенным нуклеотидным последовательностям. Кроме того, отсутствие сшивки с белком, не обязательно вызывается экранированием пептида-мишени, малейшее изменение положение реакционно-способной группы или фиксация этой группы в результате конформационного перехода в рибосоме, даже очень незначительного, могут сделать так, что группа не сможет дотянуться до пептида-мишени. Это особенно нужно учитывать в случае экспериментов с окисленной периодатом 3'-концевой рибозой, которая может реагировать только с определенными функциональными группами белков.

Безусловно, отмеченные недостатки не могут заслонить тот факт, что представленная работа выполнена очень искусным и опытным специалистом и содержит ряд очень интересных и полезных наблюдений, а сам подход без сомнения заслуживает дальнейшего развития. Сделанные замечания не снижают общую положительную оценку диссертации Д.Е. Шарифулина.

Выводы диссертационной работы корректны и полностью обоснованы полученным экспериментальным материалом. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

### **Значимость работы для науки и практики**

Разработанные автором методы исследования сложных нуклеиново-белковых комплексов, таких как рибосома и ее комплексы с лигандами, вовлеченными в трансляцию, наверняка найдут себе применение и в других областях молекулярной биологии, включая те, которые не связаны прямо с биосинтезом белка.

Опубликованные подходы и методики могут найти свое применение в таких ведущих институтах РАН как – Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Институте биохимии имени А.Н. Баха РАН, Институте белка РАН, ИБХ РАН и др. , а также в НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского (ФГОУВПО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова) и других научных учреждениях РФ биологического профиля.

### **Публикации и апробация работы**

Результаты диссертации опубликованы в 4-х статьях в солидных рейтинговых международных журналах, а также доложены на 6 международных и российских конференциях.

Высокий экспериментальный и теоретический уровень диссертации, разнообразие используемых подходов и важность полученных результатов, открывающих новые перспективы исследования нуклеиново-белковых взаимодействий в сложных комплексах, позволяет с полным основанием заключить, что диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК, изложенным в пунктах 9-14 Постановления Правительства РФ “О порядке присуждения ученых степеней” N 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор Дмитрий Евгеньевич Шарифулин безусловно заслуживает ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании лаборатории структуры и функции генов человека (ЛСФГЧ) ИБХ РАН 26 мая 2017 г.

Старший научный сотрудник ЛСФГЧ ИБХ РАН,



к.х.н. Бони Ирина Венедиктовна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Институт биорганической химии имени академиков М.М. Шемакина и Ю.А.  
Овчинникова»

Почтовый адрес: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Макляя 16/10

эл. почта: [irina\\_boni@ibch.ru](mailto:irina_boni@ibch.ru)

тел. 8(495)330 63 29